

〔研 究〕

梅毒血清反応 Kolmer Micro 法の検討

北海道赤十字血液センター

横田 利治 今井 豊春 沢井 久子  
城守 純子 吉田 幸子 池田 宜子

I はじめに

梅毒血清反応における補体結合反応（CF法と略）は、1906年 Wasserman が先天性梅毒児の臓器を抗原として患者血清と反応<sup>1)</sup>を行ない、梅毒の診断に有用なことを認めたのに始る。その後、Lecithin(Lec), Cardiolipin(CL), Cholesterin(Ch)等<sup>1)2)</sup>の発見により、術式の標準化、鋭敏化に大いに役立ち現在行なわれている検査法が確立された。

CF法における反応形式<sup>2)</sup>については、表1に示すように3つに大別され、理論的に最もすぐれている抗原減量法の原理にもとづく緒方法が我が国では広く行なわれている。

表1 補体結合反応の反応形式

抗 原	方 法	
CL・Le・Ch	抗 体 減 量 法	Kolmer 法 北 研 法
	抗 原 減 量 法	緒 方 法
	補 体 増 量 法	Browning 法

近年、血清検査におくる微量化、省力化という考えから、Micro Titer System<sup>6)</sup> (MTと略)に遂次移りつつある。このMT法と緒方法に利用する場合、その機構から種々不合理な点が生じ、MT法の長所が充分に生かされなくなってくる。このようなことから抗体減量法を反応原理としたKolmer法<sup>5)7)</sup>を更に微量化したKolmer Micro法について種々検討したので報告する。

II 溶血素について

溶血素量と補体量との間には実験の結果、表2<sup>7)</sup>に示すような関係がなりたつ。つまり溶血素1

表2 Relative amounts of hemolysin and complement

Reagent	Units Giving 100 Per Cent Hemolysis			
Hemolysin	1	4	10	20
Complement	1	1/3	1/5	1/10

(Clinical Serology p. 62)

単位対補体量1単位で100%の溶血が起るが、かりに溶血素を10単位にふやしてやると補体量は $\frac{1}{10}$ 量でよいということである。云うまでもなく補体結合反応の原理は、補体の関与する抗原抗体反応において、未知の抗体と既知の抗原を加え、さらに一定量の補体を加えてやると、抗原抗体反応が起つた場合に補体を取り入れる。この補体の消費すなわち溶血の有無により、反応陽性、或いは陰性と判定する方法である。したがって、補体、溶血素は最も適した量的関係になければならないことは勿論であるが、微弱な反応を的確にとらえるためには、補体量は可能な限り少量であることが望ましい。このことにより反応の鋭敏性は高まる。我々は、このような考え方から、溶血素は出来る限り高単位で使うことを基本にしている。ただ、ここで注意を要するのは、無分別に溶血素濃度を上げることは、溶血素血清が本来の溶血素として働く前に凝集素が働き、本試験の反応において凝集反応が起る。表3は、市販3社4種の溶血素について、その凝集素価を測定したものである。方法として、それぞれの溶血素を倍数稀釈を行ない、2%ヒツジ赤血球を加えて混和、氷室に1夜静置後凝集の有無について判定した。その結果は表の如く、1,000倍以上に稀釈されると、4



表3 溶血素のメーカー別凝集素価

溶血系 区 別	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
E 社	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
K 社 (Lot. No. 007)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
" 社 (Lot. No. 002)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
T 社	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—

表4 溶血素使用量測定法

試験管又はト レイ No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
溶血素希釈 (倍)	1,000	1,500	2,000	3,000	4,000	6,000	8,000	12,000	16,000	24,000	32,000
2%綿羊血球 浮遊液	各管に 0.5mlずつとる										
	溶血素希釈液に薄い方から順に 0.5ml混和しながら加える										
	よく混和後室温に30分放置し感作する										
30倍希釈補体	0.025mlドロッパーで各 Well に2滴 (0.05ml) ずつとる										
Mg 食 塩 水	0.025mlドロッパーで各 Well に2滴 (0.05ml) ずつ加え混和する										
感 作 血 球	0.025mlドロッパーで各 Well に2滴 (0.05ml) ずつ加え混和する										

37°C30分反応 完全溶血の Well の処が1単位

種類の溶血素血清ともその凝集素価は消滅することが判明した。したがって、溶血素単位の決定には、1,000倍稀釈を最低条件として、出来る限り高単位の溶血素価を選択するようにしている。

### 1. 溶血素使用量測定法

Kolmer 法の特徴の1つに、溶血素をやや粗く定量し溶血素単位を確定したうえで、補体をより細かく定量する点が挙げられる<sup>3)</sup>。測定方法は表4に従って行なう。完全溶血を示した Well を終末点とし、それを1単位とする。前述の実験から1,000倍稀釈に最も近い処で任意の単位を選択する。例えば、Well No. 8, 12,000倍が1単位であれば、その溶血素血清を1,200倍即ち10単位の溶血素単位を設定し、Well No. 7, 8,000倍の処であれば、1,000倍即ち8単位溶血素を選択する。

### 2. 溶血系統の作り方

緒方法<sup>9)10)</sup>は5単位、Kolmer 原法<sup>5)</sup>は3単位と云うように、溶血素単位はそれぞれの方法により固定されていり。しかし、我々は、補体を出来る限り少量で実施するという基本的な考えから、溶

表5 溶血系統の作り方実例表

最小溶血量	Mg(ml)	Hemlegin (ml)	血球 沈渣	備 考
1 : 6000 (6単位)	100	1.0 (1 : 10)	2.0	溶血系希釈は1,000倍付近を基準にし任意の溶血系単位を選択すると便利である
	50	0.5 (1 : 10)	1.0	
	25	0.25 (1 : 10)	0.5	
1 : 8000 (8単位)	100	1.0 (1 : 10)	2.0	
	50	0.5 (1 : 10)	1.0	
	25	0.25 (1 : 10)	0.5	
1 : 12000 (10単位)	100	1.0 (1 : 10)	2.0	
	50	0.5 (1 : 10)	1.0	
	25	0.25 (1 : 10)	0.5	



表6 補体価の定量法

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1:30 補 体	1.30	1.00	0.80	0.63	0.50	0.40	0.32	0.25	0.20
mg 食 塩 水	1.70	2.00	2.20	2.37	2.50	2.60	2.68	2.75	2.80
混 和									
Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
親 希 釈 補 体	0.025 ドロ ヱ ヱ ー で No. 9 より 順 に 3 滴 ( 0.075ml ) 移 す								
mg 食 塩 水	0.025 ドロ ヱ ヱ ー で 1 滴 ( 0.025ml ) づ つ 加 え ミ キ サ ー で 軽 く 振 盪								
感 作 血 球	0.025 ドロ ヱ ヱ ー で 2 滴 ( 0.05ml ) づ つ 加 え ミ キ サ ー で 約 1 分 振 盪								

37℃30分解卵器放置後観察鏡で判定

血素単位は可能な限り高単位を自由に選択する方法をとっている。表5はその実例である。

なお感作血球の使用量は

(1検体に用いる量×検体数(A)) ml + 補体  
定量に用いる量 = (0.05×8×A) ml + 1.0 =  
(0.4A)ml + 1.0ml である。

例えば、50検体を検査する場合は (0.4×50)  
+ 1 = 21ml となる。多少の余裕と計算上の便利  
さを考えて25ml 作るとよい。

III 補体について

凍結乾燥されたものは指定 とうり 原量 にもど  
す。完全に溶解したならば、補体 0.2ml + Mg 食  
塩水 5.8ml → 6.0ml を作り、この 1:30補体 6  
ml と残りの補体とを氷水中に立てて置く。

1 補体価の定量

小試験管9本用意し、先に作った1:30補体を  
表6にしたがつてくばり、Mg 食塩水を加えて全  
量 3.0ml になるようにする。(表6) この補体  
稀釈を補体の親稀釈 (master dilution) という。  
以下表にしたがつて作業を進める。

判定は観察鏡があれば便利であるが、なくても  
明るい光を上部より通して、トレーの裏側 (底)  
から観察するとよい。判定結果の記載は下記のよ  
うに行なう。

100%溶血 (完全溶血)	0
底に血球がわずかに残っている	0
25%の血球が残っている	1

50%の血球が残っている。	2
75%の血球が残っている。	3
100% (完全不溶血) が残っている	4

(注) 1) この記載例は緒方法と逆になつている。  
必ずしもこの方法でなくてよい。

2) 稀釈補体は余るので、各 Well 共3列ずつ分注  
することにより、精度、再現性が同時にチェックでき  
る。筆者らはこのように行なつている。

1 単位の補体の決めかたは、Well No. の若い  
ほうから見て‘0’を示す終末点を1単位として計  
算する<sup>4)</sup>。

例えば、Well No. 5 が終末点とすればその計算  
式は

$$\frac{30}{1 \text{ 単位を示す補体量}} = \frac{30}{0.5} = 60$$
  
したがつて、補体血清を60倍に稀釈すれば  
0.025ml 中に1単位の補体が含まれていること  
になる。なお、本試験では2単位補体を使用する  
ために、1単位補体を2滴 (0.05ml) 加えること  
になる。

2 補体活性の経時的変動

CF法に働く補体は、温度、時間等の条件によ  
りその活性が変動すると云われている<sup>14)</sup>。私共血  
液センターのように、毎日大量のCF法を処理し  
なければならない職場では、本試験における1次  
反応を4℃4時間乃至1夜放置することは、種々  
の面において不都合が起きてくる。そこで、補体  
活性がどのように変動するかをチェックしてみた







例 二	128×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	64×	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	32×	0	0	1	2	3	4	3	0	0	0
	16×	0	1	3	4	4	4	4	1	0	0
	8×	3	4	4	4	4	4	4	2	0'	0
	4×	4	4	4	4	4	4	4	4	2	0
例 三	32×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16×	0	0	0	0	1	1	0'	0	0	0
	8×	0	0	0	1	3	4	3	0	0	0
	4×	0	1	2	3	4	4	4	2'	1	0
例 四	32×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8×	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4×	0	1	1	1	2'	3	3	2'	1	0

表9 Kolmer Micro 法本試験術式

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	備 考
Mg 食塩水(0.025)		1	1	1	1	1	1	1	→ 0.025する
被 検 血 清 (ml)	約 0.1								
血清希釈度 (倍)		2	4	8	16	32	64	128	
補 体 (0.05)		1	1	1	1	1	1	1	軽く混和する
抗原 (160倍 0.025)		Cr	1	1	1	1	1	1	

マイクロミキサーで約1分間振盪後, 37°C恒温槽で1時間。(第1段の反応)

感 作 血 球 (0.05)		1	1	1	1	1	1	1	
----------------	--	---	---	---	---	---	---	---	--

マイクロミキサーで約45秒間振盪後, 37°C恒温器で30分間。判定。

\*Crは1:40エタノール

清で Box Titration を行なつたものである。例1は Kolmer titer 64倍, 以下例2は32倍, 例3は8倍, 例4は4倍であるが, ここで共通していることは, 緒方抗原 160倍希釈の処に本法における最適比があることである。なお, この 160倍は文献<sup>5)6)</sup>の4単位抗原に相当し, このようなことから, 本試験においては, 緒方抗原 160倍希釈が最も適当であると考えらる。

## V 本試験の実施方法

MT用プレートは横に使用する。したがつて1検体につき8 Well を使用するので, 1枚のプレートで10検体の検査を行なう。なお, 市販のプレートは12例になつていたので余つた2例は, それぞれ陽性, 陰性血清を用いて Control に利用する。

### 1 定量法術式



1) 表9に従って行なう。まず No. 1 の Well に被検血清 0.1ml 入れる。

2) No. 2 以降の Well に Mg 食塩水を 0.025 ml 用ドロップパーで1滴ずつ滴下する。

3) No. 1 Well より 0.025ml 用ダイリユーターで被検血清を取り、No. 2 Well に移し混和する。以下 No. 8 Well まで倍々稀釈を行なう。

4) 1単位補体を 0.05ml 用ドロップパーで No. 2 以降に1滴ずつ加えマイクロミキサーで軽く混和する。

5) No. 2 Well に 1 : 40 エタノールを 0.025ml 加える。

6) No. 3 以降に緒方抗原 160倍稀釈液を 0.025 ml ずつ加え約1分、マイクロミキサーで振盪混和後37°C恒温器で1時間反応する(第1段の反応)。

7) 第1段の反応が終る約30分位前に感作血球を37°C恒温槽で温めておき、第1段の反応が終了したら、0.05ml 用ドロップパーで1滴ずつ加え、振盪混和する。この場合は約45秒位が体験的に最もよい。

8) 判定は75%不溶血、即ち‘3’以上を陽性とし、抗体価を決定する。

(注) 我々はセミオートダイリユーターを使用しているので Well No. 1 に血清を入れ、No. 2 から試験に供している。セミオートダイリユーターを使わない場合は8 Well 全部利用出来る。

2. 第1段の反応は4°C1夜のほうが、定量値の感度がよい。定性試験のみの場合は37°C1時間で充分である。

## 2 定性試験 (大量検査の場合の簡便法)

我々血液センターでは、毎日大量の検体を処理しなければならない。そこで Screening test として次のような方法を採用している。

1) Well は1検体4個、したがって、No. 1 と No. 5 の Well に被検血清を約 0.1ml 入れる。

2) No. 2 と No. 6 は対象とする。

3) No. 3, 4, 7, 8 に抗原を入れる。従って血清稀釈度は、4.8倍となり、1枚のプレートで20検体行なう。

4) 第1段の反応は37°C1時間である。この方法で異常を認めたものは必ず前述の定量法を追試し最終判定する。

## VI 緒方法と Kolmer Micro 法との抗体価の相関について

血清検査分野における抗体価の数値は絶対的なものではない。例えば、緒方法の抗体価10倍と云うのは、次の20倍で陰性であるが、10倍では陽性である。この10倍の意味は、15倍でも18倍の処でも陽性に反応するかも知れないと解釈出来る。Kolmer 法でも同様である。

表10

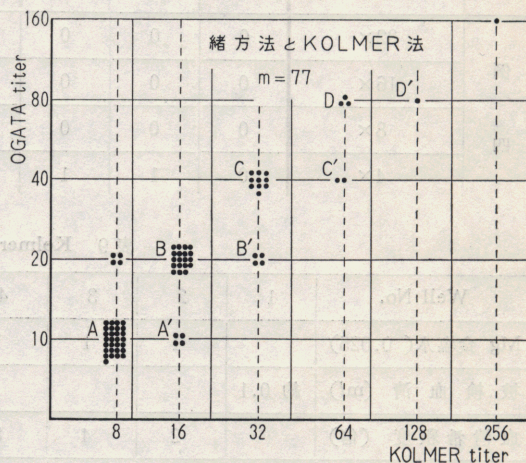


表10は、CF法陽性と判定された77例について、それぞれ定量試験を行なった結果である。前記のような解釈に立てば、緒方法10倍、Kolmer 法8倍29例(A)緒方法10倍、Kolmer 法16倍4例(A')は同一反応の場合において陽性を示すものと考えられる。以下 B, B', C, C', D, D' 等両方共に一致をみたもの77例中73例95%であつた。また、緒方法20倍、Kolmer 法8倍と緒方法の感度が良かったものが4例認められた。

## VII まとめ

今回、梅毒血清反応における省力化を目的として Micro Titer System による検査法について検討した。その結果

1. 反応形式は、抗体減量法による Kolmer Micro 法である。



2. 溶血素血清は 1,000倍稀釈を基準にし任意の可能な限り高単位を設定する。

3. 補体価は 2 単位とし、溶血素、補体価の測定は本試験における条件と同一にするためすべてプレートによつて行なう。

4. 定性試験における第 1 段の反応は、37°C 1 時間の方法で充分である。

5. 従来より行なっていた緒方法との相関性においても良い結果が得られた。

終りに、本内容の要旨については第30回北海道衛生検査学会に報告した。なお、本文についてご校閲いただきました当血液センター伊藤先生に深く感謝の意を表します。

ます。

【要 旨】

## 文 献

- 1) 成人病：Vol. 13, No. 1, 1972.
- 2) 衛技講座，第 5 巻血清学，昭44年.
- 3) 伝研学会：臨床細菌学提要，昭28年.
- 4) 伊藤碩候外：医学のあゆみ，Vol. 74, No. 12, 1970.
- 5) 予研学会：ウイルス実験学総論，昭43年.
- 6) 富山哲雄：臨床検査，Vol. 16, No. 2, 1972.
- 7) Clinical Serology, 1964.
- 8) Syphilis a Symopsis, 1972.
- 9) 厚生省監修：梅毒血清反応検査指針，昭44年
- 10) 富沢孝之：日常検査シリーズ，梅毒血清反応，1972.

